

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

REC'D 27 DEC 2001

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

12

Applicant's or agent's file reference PC-2000934	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/SE00/01743	International filing date (day/month/year) 07.09.2000	Priority date (day/month/year) 08.09.1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <sup>7</sup> C 12 M 1/42, C 12 N 13/00		
Applicant Genovis AB et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand  29.03.2001	Date of completion of this report  12.12.2001
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88	Authorized officer  Viveca Norén/BS Telephone No. 08-782 25 00

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1998)

**I. Basis of the report****1. With regard to the elements of the international application:\***

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-9, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement) under article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 10-11, filed with the letter of 12.10-2001
- ☒ the drawings:  
pages 1-5, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

**2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.**

These elements were available or furnished to this Authority in the following language English which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☒ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

**3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:**

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

**4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:**

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheet/fig \_\_\_\_\_

**5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2 (c)).\*\***

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	<u>1-11</u>	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>1-11</u>	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-11</u>	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations (Rule 70.7)**

The present examination report concerns the amended claims filed 12-10-2001. These claims have been changed to focus on a method for introduction/extraction of bioparticles into/from a membrane-enveloped structure instead of the device for such a method, which was the main subject of the original claims.

Reference is made to the following documents:

D1: Biophysical Journal, Volume 71, August 1996,  
Timothy E. Vaughan et al, "Energetic Constraints  
on the Creation of Cell Membrane Pores Magnetic  
Particles" page 616 - page 622

D2: Bioclectrochemistry and Bioenergetics, Volume 46,  
1998, Timothy E. Vaughan et al, "Molecular change  
due to biomagnetic stimulation and transient  
magnetic fields: mechanical interference  
constraints on possible effects by cell membrane  
pore creation via magnetic particles"  
page 121 - page 128

D1 and D2 both describe the hypothesis that magnetic particles in the body can cause pores in the cell membranes when exposed to a pulsed magnetic field. There is however no clear indication in the documents that such creation of pores could be used for the purposes named in the present application, i.e. introducing/extracting bioparticles into/from biological membrane-enveloped or specific lysis of cells. Therefore D1 and D2 are considered to describe the general state of the art.

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V

No document describing the method of claims 1-9 or the device performing it (claims 10-11) has been found and the invention according to claims 1-11 is novel and involves an inventive step.

CLAIMS

1. A method for introduction or extraction of  
bioparticles into/from biological membrane-enveloped  
5 structures, comprising:

applying a magnetic alternating field to a sample  
comprising biological membrane-enveloped structures and  
magnetically susceptible particles, whereby an increase  
of the thermal and/or kinetic energy of said magnetically  
10 susceptible particles causes the formation of pores in  
said biological membrane-enveloped structures,

which pores allows the introduction or extraction of  
bioparticles into/from said biological membrane-enveloped  
structures.

15 2. A method according to claim 1, wherein said  
magnetic field has an alternating field direction of a  
frequency in the range 1-5 MHz.

3. A method according to claim 1 or 2, wherein said  
magnetic field has a field strength of 1 mT.

20 4. A method according to any one of claims 1-3,  
wherein said magnetic field is non-homogeneous and has an  
alternating gradient field direction, the direction of  
said alternating gradient field being generated by two  
coils, and said sample is inserted between the coils.

25 5. A method according to claim 4, wherein said coils  
are supplied with alternating currents of different  
frequencies.

6. A method according to claim 4, wherein said coils  
are supplied with either the positive or the negative  
30 part of the supplied alternating current.

7. A method according to any one of claims 1-6,  
wherein said bioparticles are selected from the group  
comprising DNA molecules, RNA molecules, proteins, other  
biopolymers, peptides, chemical preparations, organic  
35 compounds, inorganic compounds or synthetic polymers or  
combinations thereof.

11

8. A method according to any one of claims 1-7,  
wherein said biological membrane-enveloped structures are  
selected from the group comprising of body tissues,  
cells, bacteria, virus particles, organelles at a  
5 subcellular level, liposomes or proteins.

9. A method according to any one of claims 1-8, for  
use for specific lysis of cells.

10. A method according to any one of claims 1-8, for  
use for modifying the genetic code of a host cell and/or  
10 metabolism.

11. A device for performing the method as defined in  
any one of claims 1-10, comprising at least one coil for  
generating a magnetic alternating field, optionally, a  
thermostat for accurate temperature control of said at  
15 least one coil, a means for variabel and accurate timing  
control of the time during which said alternating current  
is on and during which a sample to be treated is exposed  
to said applied magnetic field, and control system for  
accurate setting of strength and frequency of said  
20 alternating current.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
15 March 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/18168 A1**

(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C12M 1/42,  
C12N 13/00

Sarah [SE/SE]; Möllarevägen 1, S-245 61 Staffanstorp  
(SE). KRIZ, Dario [SE/SE]; Bosjökloster Bomhuset,  
S-243 95 Höör (SE).

(21) International Application Number: PCT/SE00/01743

(74) Agent: AWAPATENT AB; Box 5117, S-200 71 Malmö  
(SE).

(22) International Filing Date:  
7 September 2000 (07.09.2000)

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AT  
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,  
CH, CN, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility  
model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EE, EE (utility  
model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KR (utility  
model), KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,  
SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Filing Language: Swedish

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
9903183-3 8 September 1999 (08.09.1999) SE  
9903185-8 8 September 1999 (08.09.1999) SE  
9903187-4 8 September 1999 (08.09.1999) SE

(71) Applicant (*for all designated States except US*): GENO-  
VIS AB [SE/SE]; Ideon, S-223 70 Lund (SE).

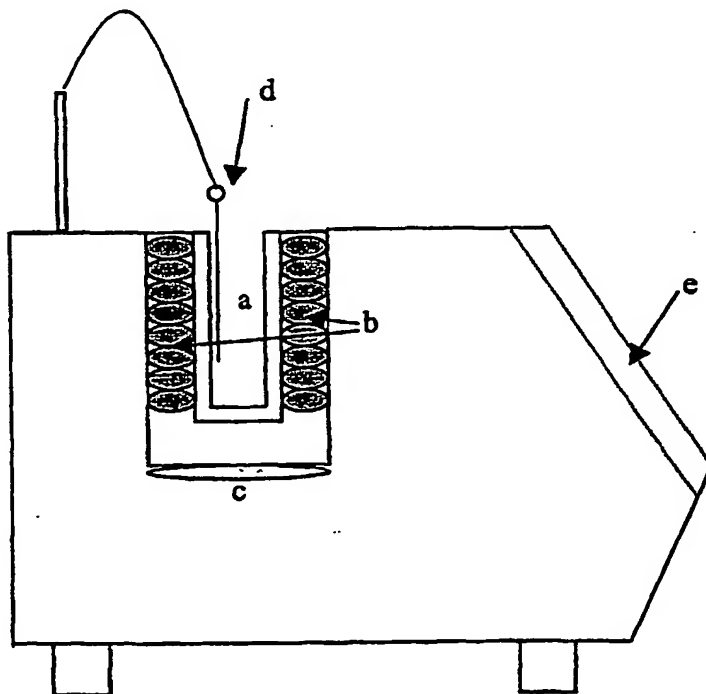
(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): FREDRIKSSON,

[Continued on next page]

(54) Title: DEVICE FOR INTRODUCING PORES INTO BIOLOGICAL MATERIALS



(57) Abstract: The present invention relates to a device for creating pores in a biomaterial, such as a cell or tissue in a sample. The device uses an alternating magnetic field that increases the thermal or kinetic energy of magnetic particles present in the sample. The magnetic particles then create pores in the membrane surrounding the biostructure. Subsequently, the pores may be employed for the introduction of particles into the biostructure. In preferred embodiments the device is equipped with temperature control.

WO 01/18168 A1



**Published:**

- *With international search report.*
- *Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.*

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 00/01743

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12M 1/42, C12N 13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C12M, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Biophysical Journal, Volume 71, August 1996, Timothy E. Vaughan et al, "Energetic Constraints on the Creation of Cell Membrane Pores by Magnetic Particles" page 616 - page 622  --	1-13
X	Bioclectrochemistry and Bioenergetics, Volume 46, 1998, Timothy E. Vaughan et al, "Molecular change due to biomagnetic stimulation and transient magnetic fields: mechanical interference constraints on possible effects by cell membrane pore creation via magnetic particles" page 121 - page 128  -----	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 January 2001

Date of mailing of the international search report

08-01-2001

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Henrik Nilsson/Eö

Telephone No. +46 8 782 25 00

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 00/01743

## B x I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **1-11**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**see next sheet**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/SE 00/01743**

Present claims 1-11 relate to an apparatus defined by reference to a desirable characteristic or property, achieved by generating an alternating magnetic field in the apparatus. Thereby, pores in biological structures covered by membranes are created by magnetic particles present in a sample. The claims cover all apparatus having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and / or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such apparatus. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the apparatus by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out based on the disclosures of the description.

## PCT REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty

For receiving Office use only	
<b>PCT/ SE 00 / 0 1 7 4 3</b>	
International Application No.	
<b>0 7 -09- 2000</b>	
International Filing Date	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> <b>The Swedish Patent Office</b>  <b>PCT International Application</b> </div>	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired)(12 characters maximum)	<b>2000934</b>

<b>Box No. I TITLE OF INVENTION</b>	
Device for introducing pores into biological materials	
<b>Box No. II APPLICANT</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)  <b>GENOVIS AB</b> <b>Ideon</b> <b>SE-223 70 LUND</b> <b>SWEDEN</b>	<input type="checkbox"/> This person is also inventor.  Telephone No.  Facsimile No.  Teleprinter No.
State (that is, country) of nationality: <b>SWEDEN</b>	State (that is, country) of residence: <b>SWEDEN</b>
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR /FURTHER INVENTOR(S)</b>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)  <b>FREDRIKSSON, Sarah</b> <b>Möllarevägen 1</b> <b>SE-245 61 STAFFANSTORP</b> <b>SWEDEN</b>	This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
State (that is, country) of nationality: <b>SWEDEN</b>	State (that is, country) of residence: <b>SWEDEN</b>
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet	
<b>Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE</b>	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)  <b>AWAPATENT AB</b> <b>Box 5117</b> <b>SE-200 71 MÄLMÖ</b> <b>SWEDEN</b>	Telephone No. <b>+46 40 98 51 00</b>  Facsimile No. <b>+46 40 26 05 16</b>  Teleprinter No.
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent	

Sheet No. 1a

Continuation of Box No. III		FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request</i>			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)  <b>KRIZ, Dario</b> <b>Bosjökloster Bomhuset</b> <b>SE-243 95 HÖÖR</b>  <b>SWEDEN</b>		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: <b>SWEDEN</b>		State (that is, country) of residence: <b>SWEDEN</b>	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)     		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality:		State (that is, country) of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)     		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality:		State (that is, country) of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)     		This person is:  <input type="checkbox"/> applicant only <input type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality:		State (that is, country) of residence:	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.			

07-09-2000

Sheet No. 2

**Box No. V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |   |   |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AG</b> Antigua and Barbuda                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria +Utility Model                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Morocco                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BZ</b> Belize                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MZ</b> Mozambique                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic +Utility Model         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany +Utility Model                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark +Utility Model                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominica                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DZ</b> Algeria                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia +Utility Model                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland +Utility Model                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia +Utility Model                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> United Republic of Tanzania               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea +Utility Model      |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                            |   |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

07 -09- 2000

Sheet No. 3

Box No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplement Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 8 September 1999 (08.09.1999)	9903183-3	SWEDEN		
item (2) 8 September 1999 (08.09.1999)	9903185-8	SWEDEN		
item (3) 8 September 1999 (08.09.1999)	9903187-4	SWEDEN		

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): 1, 2 and 3

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

## Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)  
(If two or more International Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

Request to use results of earlier search; reference to that search

(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

ISA / SE

## Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 4 ✓  
description (excluding sequence listing part) : 9 ✓  
claims : 2 ✓  
abstract : 1 ✓  
drawings : 5 ✓  
sequence listing part of description :

Total number of sheets : 21 ✓

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☒ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference No., if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international applications into (language):
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☒ other (specify): Subauthorisation

Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1

Language of filing of the international application: Swedish

## Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

7 September 2000



Ingrid Wiklund  
Authorised Agent

For receiving Office use only		For International Bureau use only	
1. Date of actual receipt of the Purported international application:	07 -09- 2000	2. Drawings:	
3. Corrected date of actual receipt due to later but Timely received papers or drawings completing the purported international application:		<input checked="" type="checkbox"/> received:	
4. Date of timely receipt of the required Corrections under PCT Article 11(2):		<input type="checkbox"/> not received:	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/SE	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.		

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

13 OCTOBER 2000

( 1 3 10. 00 )

ANORDNING FÖR INTRODUKTION AV PORER I BIOLOGISKA MATERIAL

Tekniskt område

Föreliggande uppfinning hänför sig till en anordning för användning vid bl.a. molekyllärbiologiskt arbete.

Teknisk bakgrund

5 Inom forskningsområdena bioteknik och biomedicin är det ofta nödvändigt att föra in en större molekyl eller en biopartikel i en biologisk struktur, såsom t.ex. en bakteriecell. Celler och även virus har en yttre barriär som skydd mot omgivningen och dessutom ett selektivt  
10 transportsystem för näringsämnen. För att forcera naturliga skyddsmekanismer och föra in ett för målorganismen icke önskvärt ämne krävs därför någon typ av kemisk eller fysisk behandling av målcellen. Exempel på teknologier för att forcera cellers yttre cellmembran,  
15 och i förekommande fall även cellvägg, återfinns inom forskningsområdena genteknik och molekyllärbiologi.

Då ett nytt arvsanlag överförs till en speciellt utvald värdcell benämns tekniken transformation eller transfektion. Det finns ingen generell metod som kan  
20 användas på samtliga celltyper, utan för varje celltyp och ändamål finns en teknik. Det är vidare inte möjligt att transformera alla celltyper med de tekniker som finns tillgängliga idag. 1970 rapporterade Mandel och Higa, (*J. Mol. Bio.* 53: 159-162) att *E.coli*-celler vilka  
25 förbehandlats med  $\text{CaCl}_2$  kunde förmås att ta upp främmande DNA vid en temperaturchock. Metoden har sedan dess fortlöpande utvecklats (se bl. a US-patentansökan US97/01788). Genom att under en fraktion av en sekund utsätta celler för en elektrisk puls med hög spänning  
30 öppnas porer i cellmembran s.k., elektroporering (Zimmerman et al. *J. Membr. Biol.* 67: 165-82 (1983), vilket utnyttjas frekvent som transformationsteknik. Bakterier, jäst och i vissa fall även mammalieceller och växtceller går under speciella förhållanden att  
35 transformera med hjälp av elektroporering. Även i detta



fall pågår en fortlöpande utveckling av tekniken (se patentansökningar US97/16721, US98/16042). I båda de ovan beskrivna metodikerna öppnas cellhöljet tillräckligt länge för att DNA-molekylen skall kunna ta sig in i  
5 cellen. Den tredje och senast utvecklade metoden för transformation är s. k. lipofection (Old and Primrose, i *Principles of gene Manipulation: An Introduction to Gene Manipulation*, Blackwell Science (1995)) där det främmande DNA:t innesluts i/binder till en katjonisk liposom vilken  
10 fuserar med det yttre membranet på målcellen. Vidare finns ytterligare en kommersiell teknik för transformation av växtceller där en för ändamålet utvald del av växten bombarderas med små guld-korn vilka är preparerade med den främmande genen (Boynton J.E. et.  
15 Science 240, 1534-1538, 1988). Sådan genöverföring har utvecklats för transformation av andra vävnader, såsom bakterier, svamp, insekt och mammlieceller (Johnston S.A. Nature 346, 776-777, 1990).

Det är i ovan beskrivna tillämpningar som föreliggande  
20 uppfinning har ett stort användningsområde. Det är dock fullt möjligt att använda anordningen enligt uppfinningen för införandet av andra exogena material i tillämpningar, såsom direkt överföring av proteiner, RNA-molekyler, fettsyror, peptider, läkemedel m.m, för studier av  
25 specifika celler och virus respons. Vidare är anordningen enligt uppfinningen särskilt lämplig för lysering av celler i syfte att utföra lysering samt identifiering och isolering av specifika cellulära komponenter i ett och samma förfarande.

30 Sammanfattning av uppfinningen

Således avser föreliggande uppfinning en anordning, kännetecknad av att den innehåller minst en spole, i vilken ett magnetiskt alternerande fält kan alstras och i vilken ett prov kan införas, där nämnda magnetiska fält  
35 orsakar en ökning av den termiska och/eller kinetiska energi hos magnetiskt påverkbara partiklar som finns i nämnda prov, varvid de nämnda partiklarnas ökade termiska

och/eller kinetiska energi orsakar bildandet av porer i biologiska membranomslutna strukturer som finns i nämnda prov, varvid nämnda porer tillåter införsel eller utförsel av biopartiklar i nämnda biologiska  
5 membranomslutna strukturer.

Uppfinningen avser också ett förfarande där en anordning enligt uppfinningen utnyttjas för specifik lysering av celler. Uppfinningen avser dessutom ett förfarande där en anordning enligt uppfinningen speciellt  
10 utnyttjas för förändring av en värdcells arvsanlag och/eller metabolism.

#### Kort beskrivning av ritningar

Fig. 1 visar en principskiss av anordningen enligt föreliggande uppfinning.

15 Fig. 2 visar ett exempel på en elektronisk strömmatarkrets.

Fig. 3 visar ett exempel på en spoles uppkoppling.

Fig. 4 visar ett exempel på en magnetiskt påverkbar partikel.

20 Fig. 5 visar en anordning som kan frambringa ett gradientfält.

#### Detaljerad beskrivning av uppfinningen

Enligt en aspekt av uppfinningen är anordningen kännetecknad av att nämnda magnetiska fält har en  
25 alternerande fältriiktning med en frekvens inom intervallet 1 till 5 MHz.

Enligt en annan aspekt är anordningen kännetecknad av att nämnda magnetiska fält har en fältstyrka på minst 1 mT.

30 Enligt ytterligare en aspekt är anordningen kännetecknad av att nämnda magnetiska fält är icke-homogent och har en alternerande gradientfältsriktning, varvid nämnda alternerande gradientfälts riktning är genererad av 2 spolar, samt sagda prov infört mellan  
35 spolarna.

Enligt ännu en aspekt är anordningen enligt uppfinningen kännetecknad av att nämnda spolar matas med växelström med olika frekvenser.

Enligt ytterligare en aspekt är anordningen  
5 kännetecknad av att nämnda spolar matas med antingen den positiva eller den negativa delen av den matade växelströmmen.

Enligt ännu en aspekt är anordningen kännetecknad av att den är utrustad med en termostad för noggrann  
10 temperaturkontroll av nämnda spole eller spolar och/eller nämnda prov.

Enligt en annan aspekt är anordningen kännetecknad av att den är utrustad med en variabel tidsinställning för noggrann kontroll av den tid under vilken nämnda  
15 växelström är på, under vilken nämnda prov utsättes för nämnda pålagda magnetfält.

Enligt en annan aspekt är anordningen kännetecknad av att den är utrustad med ett reglersystem för noggrann inställning av styrka och frekvens på nämnda växelström.

20 De biologiska membranomslutna strukturerna utgörs bl.a. av kroppsvävnad, celler, bakterier, viruspartiklar, organeller på sub-cellulär nivå, liposomer eller proteiner.

De biopartiklar som är lämpliga för  
25 införsel/utförsel i membranomslutna strukturer är bl.a. DNA-molekyler, RNA-molekyler, proteiner, andra biopolymerer, peptider, kemiska preparat, organiska föreningar, oorganiska föreningar eller syntetiska polymerer eller kombinationer därav.

30 Tekniken som uppfinningen bygger delvis på är en kombination av magnetonanoteknologi och peptidkemi. En magnetisk påverkbar partikel med en storlek på mellan ett tiotal mikrometer och en nanometer utnyttjas som reagens i tekniken. Då en sådan partikel utsätts för ett visst  
35 magnetiskt fält fås den dels att vibrera dels att alstra värme. Figur 1 visar en principskiss över föreliggande uppfinning. Det biologiska provet blandas med ett för

Figur 2 visar ett exempel på en elektronisk strömmatarkrets som innehåller en oscillator (1) baserad på kretsen XR2206, vars utsignal (2) förstärks av ett effektförstärkarsteg (3), som baseras på kretsen PBD 3548/1, vars utsignal (4) kan driva en växelström (1MHz, 2 A) genom en eller flera spolar. Ett exempel på nämnda spoles uppkoppling visas i Figur 3, med en svängningskrets bestående av ett  $2\ \Omega$  motstånd (6), en  $0,50\ \text{nF}$  kondensator (7) och en  $50\ \mu\text{H}$  spole (8), nämnda krets matad med växelström (5). För en fackman är det uppenbart att ovan beskrivna exempel illustrerade i Figur 2 och Figur 3 enkelt kan modifieras och att samma resultat kan erhållas via olika alternativa uppkopplingar och spolar.

Exempel på magnetiskt material som utnyttjas i  
förfarandet enligt uppfinningen finns beskrivna i  
30 patentlitteraturen t.ex. US 4 323 056 (Borelli et al).  
Den magnetiskt påverkbara partikeln och en möjlig  
konfiguration illustreras vidare i Figur 4. Den  
magnetiskt påverkbara kärnan 9 i partikeln består i  
huvudsak av magnetit (järnoxid). Partikel är vidare täckt  
35 med ett yttre lager 10 bestående av en derivatiserad  
polymer (Dextran), eller ett monolager alternativt bi-  
lager av derivatiserade fettsyror. Valet av vilken typ

(antal aminosyra- eller kolhydratenheter och sekvens) av ligand 11 som används för derivatiseringen anpassas individuellt för varje tillämpning av den magnetiskt påverkbara partikeln, vars effekt kan förstärkas

5 ytterligare genom att dess yta vidare modifieras med en eller flera effektormolekyler 12.

Genom att tillsätta nämnda partiklar till en cellsuspension och därefter utsätta cellen för ett magnetfält med alternerande fältriiktning åstadkoms en  
10 momentan uppvärmning av det medium som omger varje magnetiskt påverkbar partikel. Värmen inducerar en temperaturchock i cell och cellmembran vilket orsakar tillfälliga öppningar i cellmembranet. Värmen induceras snabbt och homogent i hela provet vilket gör att provet  
15 och cellerna kan utsättas för behandling under en kort tid vilket ökar överlevnadsfrekvensen hos de utsatta cellerna. I Exempel 1 beskrivs transformation av *Escherichia coli*.

Vid traditionellt transformationsförfarande med en  
20 temperaturchock utsätts provröret med cellsuspensionen för en högre omgivande temperatur (42°C) varvid det uppstår en temperaturgradient från provrörsväggen och inåt i provet, vars uppbyggnad kräver en längre tidsåtgång än metoden enligt föreliggande uppfinning och  
25 vilket vidare innebär att de celler som befinner sig närmast cellväggen exponeras för den högre temperaturen under en längre tid än de i mitten av röret. Således kommer en del av cellerna dö på grund av den förhöjda temperaturen medan en fraktion av cellerna förblir  
30 obehandlade. Metoden enligt föreliggande uppfinning kringgår detta problem via den momentana uppvärmningen kring varje partikel i provbehållaren. Effekten förstärks om partikeln dessutom dirigeras direkt till cellernas hölje via ligandmolekylerna på partikelns yta.  
35 Detta är en stor fördel jämfört med konventionella transformeringsförfarande där balansen mellan värmechock och celldöd är viktig för slutresultatet.

Vidare kan det magnetiska fältets fältstyrka varieras i rummet, ett s.k. gradientfält som i kombination med alternerande fältriktning orsakar mekaniska vibrationer (kinetisk energi ökar) i partiklarna vilket i kombination med värmeutstrålningen (termisk energi) förstärker partiklarnas åverkan på cellmembranet som omger alla celler (samt cellvägg i de fall det existerar). Föreliggande uppfinning beskriver en helt ny metod med induktion av värme eller med en kraftfull introduktion av skjuvningskrafter eller en kombination därav. Skjuvningskrafterna initierar dislokationer i cellmembranet p.g.a. mekanisk utmattnings vilket leder till brott i cellmembran (och cellväggar i de fall då målcellen är t.ex. en bakterie). Förfarandet bygger på användandet av ett växlande externt pålagt gradientmagnetfält. Ett gradientfält åstadkoms med minst två spolar där nämnda spolar matas med antingen den positiva eller den negativa delen av den matade växelströmmen alternativt matas nämnda spolar med växelström med olika frekvenser. En anordning som kan frambringe ett gradientfält finns beskriven i Figur 5. Funktionsprincipen bygger på att två spolar (A) och (B) (med eller utan ferritkärna) är placerade mitt emot varandra enligt Figur 5. En kontrollenhet (C) styr strömmen genom spolarna så att spolarna endast en i taget har en ström som flyter genom dess lindningar. Denna strömalternering, vars frekvens styrs med oscillatoren (OSC), medför att spolarna växelvis skapar gradientmagnetfälten (D) och (E) med olika gradientriktningar. En magnetiskt påverkbar partikel (P) belägen mellan spolarna kommer att erfara ett gradientmagnetfält med periodiskt alternerande riktning, vilket kommer att inducera en mekanisk vibration. Alternativt kan ett gradientfält skapas då de två spolarna matas med ström av två olika frekvenser. Skillnaden i frekvens mellan strömmen i de två spolarna styr frekvensen på gradientens växling.

Genom att låta den magnetiska behandlingen äga rum under en kort tid skapas förutsättningar för ett högt antal överlevande celler efter behandlingen. Under tiden som cellhöljet är öppet skall den molekyl som skall  
5 transformeras in i cellen. För att optimera denna procedur kan även nämnda molekyl dirigeras till cellhöljet. Båda processerna genomförs genom att koppla igenkänningsmolekyler för inbindning dels till cellytan och dels till sagda molekyl på en och samma  
10 ferromagnetiska partikel. Molekyler vilka på biokemisk basis kan känna igen och binda in till biologiska strukturer av olika slag kan till exempel vara korta syntetiska peptider, delar av en antikropp eller ett enzym.

15 Genom att koppla en igenkänningsmolekyl för ett målprotein, t.ex. ett rekombinant protein, till de magnetiskt påverkbara partiklarna kan anordningen enligt uppfinningen utnyttjas för lysering och specifik upprening av nämnda målprotein i ett och samma  
20 förfarande. I jämförelse med alternativa lyseringstekniker (framförallt enzymatisk och mekanisk lysering) i kombination med ett eller flera upprepningssteg sparas vid användandet av anordningen enligt uppfinningen framförallt tid men även material.

25 Anordningen enligt uppfinningen kan med fördel användas till dels transformationsförfarande och dels till upprening av specifika cellkomponenter vilket gör nämnda anordning unik. Oavsett ändamål bör förfarandet äga rum under det att spolarna hålls vid konstant  
30 temperatur varför ett kylelement och ett temperaturreglage skall införlivas med den reglerbara magnetiska utrustningen. Vidare är det en fördel för apparaturens olika potentiella tillämpningsområden att magnetfältets styrka, frekvens samt den tid provet  
35 utsätts för behandlingen är variabla.

EXEMPEL 1:

Följande exempel beskriver en metod för transformation av *Escherichia coli* (*E.coli*) med pUC18 plasmid:

- 100  $\mu$ l kompetenta *E.coli* celler blandas vid 0°C med
- 5 500 $\mu$ g pUC18 löst i 30  $\mu$ l 0.05 M  $\text{CaCl}_2$ . Provet förs ner i provbehållaren i anordningen enligt uppfinningen och inkuberas under 30 min vid 0° C i spolen. Provet behandlas därefter i 30 sekunder vid 1MHz, 2A. Till provet sätts 1 ml steril LB-broth (LB-buljong) varefter
- 10 provet inkuberas i vattenbad under 1 h vid 37° C. Cellerna sprids därefter ut på agarplattor innehållande selektionstryck, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l ampicillin, för att endast de transformerade bakterierna skall erhållas. Försöket skall inkludera ett referensprov som inte innehåller pUC18 för
- 15 att bedöma överlevnad samt transformationsfrekvens.



PATENTKRAV

1. Anordning, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller minst en spole, i vilken ett magnetiskt  
5 alternerande fält kan alstras och i vilken ett prov kan införas, där nämnda magnetiska fält orsakar en ökning av den termiska och/eller kinetiska energi hos magnetiskt påverkbara partiklar som finns i nämnda prov, varvid de nämnda partiklarnas ökade termiska och/eller kinetiska  
10 energi orsakar bildandet av porer i biologiska membranomslutna strukturer som finns i nämnda prov, varvid nämnda porer tillåter införsel eller utförsel av biopartiklar i nämnda biologiska membranomslutna strukturer.
- 15 2. Anordning enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda magnetiska fält har en alternerande fältriiktning med en frekvens inom intervallet 1 till 5 MHz.
- 20 3. Anordning enligt något av kraven 1-2, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda magnetiska fält har en fältstyrka på minst 1 mT.
- 25 4. Anordning enligt något av kraven 1-3, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda magnetiska fält är icke-homogent och har en alternerande gradientfältsriktning, varvid nämnda alternerande gradientfälts riktning är genererad av 2 spolar, samt nämnda prov infört mellan spolarna.
- 30 5. Anordning enligt krav 4, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda spolar matas med växelström med olika frekvenser.
6. Anordning enligt krav 4, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda spolar matas med antingen den positiva eller den negativa delen av den matade växelströmmen.
- 35 7. Anordning enligt något av kraven 1-6, k ä n n e t e c k n a d av att den är utrustad med en termostat för noggrann temperaturkontroll av nämnda spole eller spolar och/eller nämnda prov.

8. Anordning enligt något av kraven 1-7, k ä n -  
n e t e c k n a d av att den är utrustad med en variabel  
tidsinställning för noggrann kontroll av den tid under  
vilken nämnda växelström är på, under vilken nämnda prov  
5 utsättes för nämnda pålagda magnetfält.

9. Anordning enligt något av kraven 1-8, k ä n -  
n e t e c k n a d av att den är utrustad med ett  
reglersystem för noggrann inställning av styrka och  
frekvens på nämnda växelström.

10 10. Anordning enligt något av kraven 1-9,  
k ä n n e t e c k n a d av att nämnda biologiska  
membranomslutna strukturer utgörs av kroppsvävnad,  
celler, bakterier, viruspartiklar, organeller på sub-  
cellulär nivå, liposomer eller proteiner.

15 11. Anordning enligt något av kraven 1-10, k ä n -  
n e t e c k n a d av att nämnda biopartiklarna är DNA-  
molekyler, RNA-molekyler, proteiner, andra biopolymerer,  
peptider, kemiska preparat, organiska föreningar,  
oorganiska föreningar eller syntetiska polymerer eller  
20 kombinationer därav.

12. Förfarande där anordningen enligt något av  
kraven 1-10 utnyttjas för specifik lysering av celler.

13. Förfarande där anordningen enligt något av  
kraven 1-10 speciellt utnyttjas för förändring av  
25 värdcells arvsanlag och/eller metabolism.

## SAMMANDRAG

Föreliggande uppfinning är en anordning, avsedd för  
5 bl.a. molekyllärbiologiskt arbete, i vilken ett biologiskt  
prov utsätts för ett alternerande magnetiskt fält, varvid  
nämnda fält genom en inducerad porbildning möjliggör  
införsel av partiklar i biologiska membranomslutna  
strukturer i nämnda biologiska prov.

10

15

20

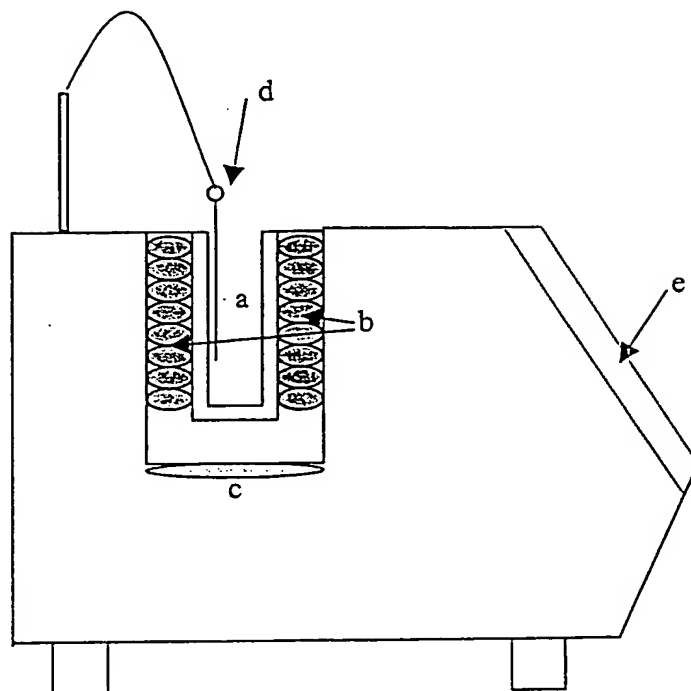
25

30

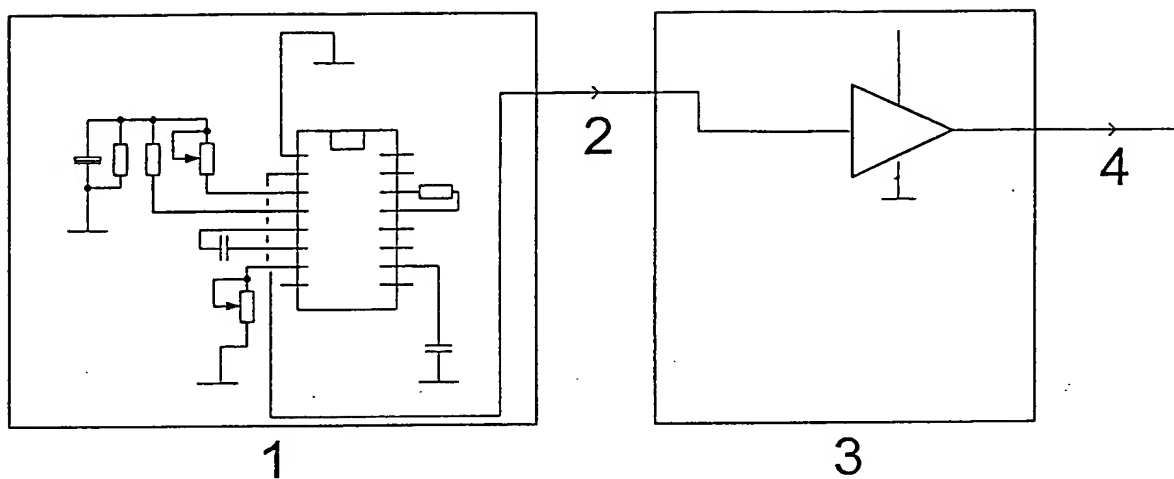
Publiceringsfigur: Figur 1.

35

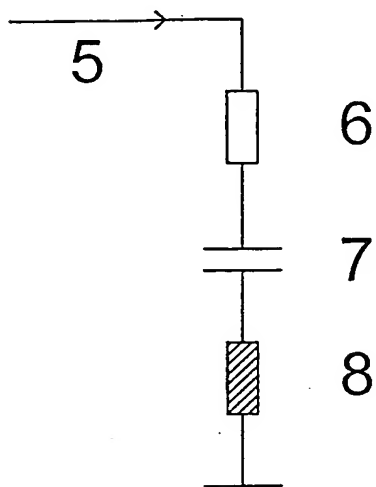
FIGUR 1.



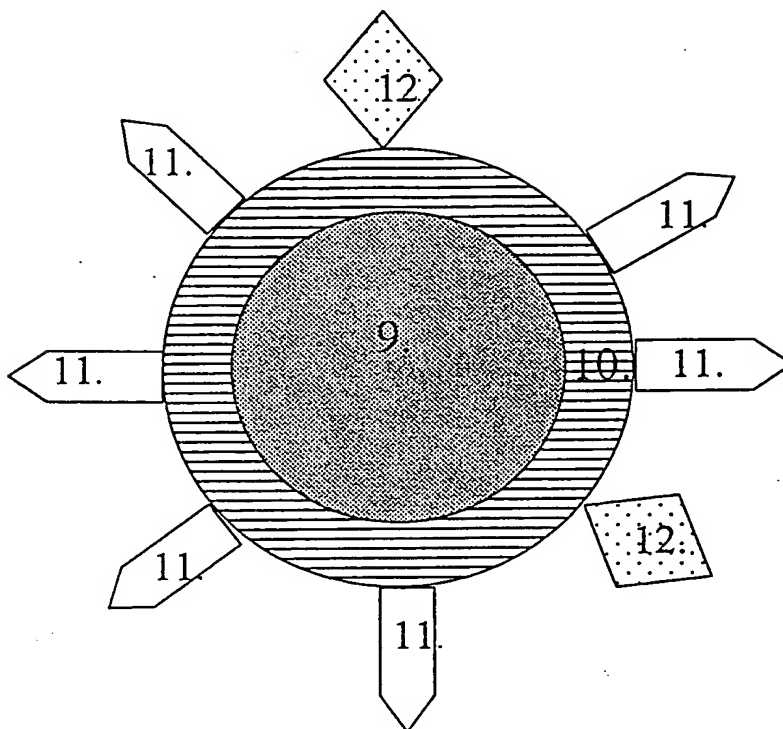
FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4.

**SUBSTITUTE SHEET**

FIGUR 5.

